

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication **02-069502**

n number :

(43)Date of **08.03.1990**

publication of

application :

(51)Int.Cl.

C08B 37/08

A61K 7/00

A61K 47/36

C12P 19/04

C12P 19/14

(21)Applicati **63-220377**

on number :

(22)Date of **05.09.1988**

filing :

(71)Applicant **K I KASEI KK**

:

(72)Inventor : **TANAKA KAZUTSUNE**

TSUMAKI KAYOKO

MIWA TADASHI

(54) WATER SOLUBLE LOW MOLECULAR CHITOSAN AND PRODUCTION THEREOF

(57)Abstract:

PURPOSE: To produce the title chitosan having a specific maximum molecular weight and soluble in an aqueous solution ranging from acid to alkaline by reacting a specific chitosan with chitosanase and simultaneously or after the reaction, turning the resultant solution to alkaline and then separating enzymatic reaction product.

CONSTITUTION: Chitosan having 60-90% deacetylation ratio is reacted with chitosanase (preferably obtained by culturing, extracting and purifying a bacterium belonging to the genus *Bacillus*, No. K-881) and simultaneously or after the reaction, an alkali (preferably NaOH aqueous solution) is added thereto to raise pH of the resultant solution to 7-10 and as necessary filtration or membrane treatment is carried out using a precise filtration membrane, etc., having 0.05-5 μ m pore size to separate enzymatic reaction product and as necessary the reaction product is dried and pulverized to provide the aimed chitosan mainly being 4000-12000 in aimed maximum molecular weight and soluble in an aqueous solution ranging from acid to alkaline.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報(A)

平2-69502

⑤ Int. Cl.⁵

C 08 B 37/08
A 61 K 7/00
47/36
C 12 P 19/04
19/14

識別記号

A 7330-4C
J 7306-4C
B 7417-4C
8214-4B
Z 8214-4B

庁内整理番号

④ 公開 平成2年(1990)3月8日

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全13頁)

⑥ 発明の名称 水溶性低分子化キトサンおよびその製造法

② 特 願 昭63-220377

② 出 願 昭63(1988)9月5日

⑦ 発 明 者 田 中 一 経 静岡県磐田郡福田町大原2285番地の1

⑦ 発 明 者 妻 木 佳 代 子 静岡県磐田市幸町2283番地の7

⑦ 発 明 者 三 輪 端 静岡県浜松市北島町246番地の4

⑦ 出 願 人 ケイ・アイ化成株式会 静岡県磐田郡福田町塩新田浜野328社

⑦ 代 理 人 弁理士 平木 祐輔 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

水溶性低分子化キトサンおよびその製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 脱アセチル化度が60-90%であるところのキトサンにキトサナーゼを作用させ、反応と同時にまたは反応後にアルカリを加えて反応液 pH を7-10に上げ、更に必要に応じて濾過または膜処理により酵素反応生成物を分離して得られる極大分子量が主として4,000-12,000であり、かつ酸性〜アルカリ性の水溶液に可溶性水溶性低分子化キトサン。

(2) フェノール硫酸法によるグルコース換算糖量が10%以下であることを特徴とする請求項1記載の水溶性低分子化キトサン。

(3) 脱アセチル化度が60-90%であるところのキトサンにキトサナーゼを作用させ、反応と同時にまたは反応後にアルカリを加えて反応液 pH を7-10に上げ、更に必要に応じて濾過または膜処理により酵素反応生成物を分離し、極大分子

量が主として4,000-12,000であり、かつ酸性〜アルカリ性の水溶液に可溶性低分子化キトサンを得ることを特徴とする水溶性低分子化キトサンの製造法。

(4) キトサナーゼがバチルス属菌(Bacillus sp.) No.K-881(微工研菌寄第10257号)により生産されたものであることを特徴とする請求項3記載の水溶性低分子化キトサンの製造法。

(5) 膜が孔径0.05 μm乃至5 μmの精密濾過膜または分画分子量1万以上の限外濾過膜である請求項3記載の水溶性低分子化キトサンの製造法。

(6) 膜が孔径0.05 μm乃至5 μmのセラミックフィルターである請求項3記載の水溶性低分子化キトサンの製造法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、種々の工業的用途に用いられる(極大分子量4,000-12,000の低分子化キトサンを主を含む)水溶性低分子化キトサン及びその製造法に関する。

〔従来の技術〕

キトサンは、2-アミノ-2-デオキシ-D-グルコースが β -1,4結合した塩基性多糖類で、通常はキチンを脱アセチル化することにより得られる。このキトサンは水には溶解しないが希酸水溶液には溶ける。しかしながら高分子化合物であるために粘度が高く、また中性乃至アルカリ性になると不溶化するためにキトサンの使用用途はおのずから限定されてくる。従って水溶性の低分子キトサンを得る技術の確立が強く要望されている。そこでキトサンの低分子化が種々検討されてきたが、従来技術でキトサンを処理して低分子化しても極大分子量4,000-12,000で酸性乃至アルカリ性の水溶液に溶けるものは得られない。

従来、中性の水にも溶解可能な低分子キトサンを得る方法としては、キトサンに塩素ガスを接触させて低分子化する方法(特開昭60-186504号)、あるいは亜硝酸塩処理による方法(特開昭60-184002号)がある。しかしながらこれらの方法により生成した水溶性の低分子化キトサンはいずれ

も極大分子量が3,000以下と小さく、またこれらの酸化分解法は、酸化による脱アミノ化のために純粋な低分子化キトサンを得ることが困難であるという欠点を有している。

キトサンを低分子化する別法として、過酸化水素水による分解法(特開昭54-148890号)または過硼酸ソーダ水溶液で処理する方法があるが、これらの方法で得られる低分子化キトサンはその分子量が低くても12,000程度であるため、中性乃至アルカリ性の水にこれを溶解させることは出来ない。

これに対して、酵素法によりキトサンを低分子化する方法がある。キトサンを分解する酵素としては主にキトサナーゼが報告されている。キトサナーゼを生産する微生物としてミクソバクター(Myxobacter)AL-1〔ヘッジ&ウォルフ:ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(A.Hedges & R.S. Wolfe: Journal of Bacteriology)第120巻,第844~853頁(1974年)〕、バチルス(Bacillus sp.)R-4〔トミナガ他:ビオヒミカ・エ・ビオフィジカ・アクタ(Y.Tominaga et al: Biochimica

et Biophysica Acta)第410巻,第145~155頁(1975年)〕、バチルス(Bacillus sp.)No99-5〔堀内:特開昭60-180585号;日本農芸化学会昭和59年度大会講演要旨集,第550頁(1984年)〕、バチルス(Bacillus sp.)No7-M〔大宝ら:特開昭61-280277号〕、アルカリゲネス(Alcaligenes)MHK-3株〔矢吹ら:特開昭62-201571号〕、バチルス・サーキュランス(Bacillus circulans)LCC-1株〔矢吹ら:特開昭63-94971号〕、バチルス・プミルス(Bacillus pumilus)BN-262〔武部ら:特開昭63-63382号〕、アルカリゲネス・ファエカリス(Alcaligenes faecalis)IK-5〔市川ら:日本農芸化学会昭和63年度大会講演要旨集,第536頁〕といった細菌が知られている。また、以上の他にストレプトミセス(Streptomyces sp.)No6〔ブライスら:ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(J.S.Price et al: Journal of Bacteriology)第124巻,第1574~1584頁(1975年)〕、ストレプトミセス・グリセウス(Streptomyces griseus)HUT 6037〔大宝ら:キチン・キトサン・アンド・

リレイテッド・エンザイム(Chitin, Chitosan and Related Enzymes)第147~160頁(1985年)アカデミック・プレス(Academic Press)〕、ストレプトミセス(Streptomyces sp.)WAK-861〔寺田ら:日本農芸化学会昭和62年度大会講演要旨集第651頁〕およびペニシリウム・イスランディクム(Penicillium islandicum)QM7571〔フェントン他:ジャーナル・オブ・ジェネラル・ミクロバイオロジー(D.M.Fenton et al: Journal of General Microbiology)第126巻,第151~165頁(1981年)〕がキトサナーゼを生産することが知られている。

これらのうちバチルスNo99-5のキトサナーゼとペニシリウム・イスランディクムのキトサナーゼについてはキトサンの脱アセチル化度と酵素分解性との関係について研究されているが、分子量の比較的大きな生成物に関する報告は見あたらない。〔発明が解決しようとする課題〕

本発明らは、キトサンに関する上記の事情に鑑みて、極大分子量が主として4,000-12,000であ

り、かつ酸性～アルカリ性の水溶液に可溶な水溶性低分子化キトサンおよびその製造技術を確認することが当業界における重要な技術的課題であるとの認識を有するに至った。

〔課題を解決するための手段〕

そこで、本発明者らは、水溶性低分子化キトサンについて鋭意検討した結果、原料として種々の脱アセチル化度を有するキトサンを用いてこれにキトサナーゼを作用させ、膜処理により低分子化キトサンを得たところ原料のキトサンの脱アセチル化度と得られた水溶性低分子化キトサンの分子量とに関連があることを見出した。すなわち、脱アセチル化度の比較的低いキトサンを用いると極大分子量10,000前後の水溶性低分子化キトサンが得られるが、原料のキトサンの脱アセチル化度が90%を超えると得られる水溶性低分子化キトサンの分子量が低下する傾向が認められ、更に脱アセチル化度100%付近のキトサンを用いた場合には、極大分子量約1,000の低分子化キトサンは水溶性となるが、極大分子量約2,000の低分子化キトサ

ンは水に不溶であった。また、従来の化学的処理方法によるキトサンの低分子化では、生成した低分子キトサンの脱アミノ化が避けられなかったが、反応特異性の高い酵素（キトサナーゼ）を用いることにより、脱アミノ化の程度の極めて低い水溶性低分子化キトサンを温和な条件で得ることが可能となった。この脱アミノ化の程度を規定するために、フェノール硫酸法を採用した。すなわち、キトサンを構成するグルコサミンやN-アセチルグルコサミンといったアミノ糖をフェノール硫酸法により発色した場合には490nm付近の吸収が認められないが、脱アミノ化により生じた糖はフェノール硫酸法により490nm付近にピークが認められるようになることを利用したものである。本発明者らはこれらの知見に基づいて本発明を完成するに至った。

本発明は、極大分子量が主として4,000-12,000であり、かつ酸性～アルカリ性の水溶液に可溶な水溶性低分子化キトサン及びその製造法を提供することを目的とするものである。

本発明は、以下の(1)～(6)の技術的事項によって構成されるものであり、当該(1)～(6)の各発明は全て本発明の範囲に含まれる。

- (1) 脱アセチル化度が60-90%であるところのキトサンにキトサナーゼを作用させ、反応と同時にまたは反応後にアルカリを加えて反応液pHを7-10に上げ、更に必要に応じて濾過または膜処理により酵素反応生成物を分離して得られる極大分子量が主として4,000-12,000であり、かつ酸性～アルカリ性の水溶液に可溶な水溶性低分子化キトサン。
- (2) フェノール硫酸法によるグルコース換算糖量が10%以下であることを特徴とする上記(1)の水溶性低分子化キトサン。
- (3) 脱アセチル化度が60-90%であるところのキトサンにキトサナーゼを作用させ、反応と同時にまたは反応後にアルカリを加えて反応液pHを7-10に上げ、更に必要に応じて濾過または膜処理により酵素反応生成物を分離し、極大分子量が主として4,000-12,000であり、かつ酸性

～アルカリ性の水溶液に可溶な低分子化キトサンを得ることを特徴とする水溶性低分子化キトサンの製造法。

- (4) キトサナーゼがバチルス属菌(*Bacillus* sp.) NaK-881(微工研菌寄第10257号)により生産されたものであることを特徴とする上記(3)の水溶性低分子化キトサンの製造法。
- (5) 膜が孔径0.05 μ m乃至5 μ mの精密濾過膜または分画分子量1万以上の限外濾過膜である上記(3)の水溶性低分子化キトサンの製造法。
- (6) 膜が孔径0.05 μ m乃至5 μ mのセラミックフィルターである上記(3)の水溶性低分子化キトサンの製造法。

続いて、本発明の構成につき更に詳しく説明する。

本発明において用いられる原料のキトサンは、従来公知のキトサンのうち脱アセチル化度60-90%のものが使用でき、例えば市販されているキチンまたは天然に存在するキチンを常法により脱アセチル化して得られるキトサンや、脱アセチル化

度90%以上のキトサンをアセチル化して得られるキトサン等が挙げられる。前者の例としては例えばかに殻を脱灰、脱蛋白してえられるキチンを濃度30-50%の水酸化ナトリウム水溶液に浸漬し、50-130℃で目的の脱アセチル化度になるように反応時間を設定して反応させた後、アルカリを除去し、次いで水洗乾燥して得られたフレーク状または更に粉碎された粉末状の乾燥物質が挙げられる。また、脱アセチル化度60%未満の原料キトサンを用いて本発明の製造法に従って調製した場合には、より高分子で水溶性の低分子化キトサンが得られる。酵素処理量を増やすか、または反応時間を長くすることにより、極大分子量が4,000-12,000の水溶性の低分子化キトサンを得ることも不可能ではないが、生産効率は脱アセチル化度60-90%のキトサンに比べて劣る。また、この場合に得られた低分子化キトサンは、単位重量あたりのアミノ基含量が少なく、ポリカチオン性の効果が劣り、本発明の実施には適当ではない。

本発明において、キトサナーゼを原料キトサン

化キトサンの分子量分布は反応時間あるいは酵素量等によって変化するため、目的とする分子量の水溶性キトサンを高収率に得るためには反応時間（または酵素量）と生成物の分子量との関係に基づいて、反応条件を厳密に決定する必要がある。

なお、本発明に使用するキトサナーゼは、脱アセチル化度60-90%のキトサンを分解して、極大分子量4,000-12,000の低分子化キトサンを主として生成することができる酵素であれば、いかなるものであってもこれを使用することができる。例えば、市販のキトサナーゼ（販売：和光純薬、*Bacillus pumilus* BN-262由来）は本発明に使用し得るものであるが、非常に高価であるため、酵素処理によって製造する水溶性低分子化キトサンも非常に高価なものとなる。

そこで本発明者らは、広く自然界より安価にキトサナーゼを生産しうる微生物の検索を行った結果、土壌中より分離したバチルス属菌(*Bacillus* sp.) NaK-881(微工研菌寄第10257号)がキトサナーゼを効率良く生産すること等の知見を得た。

に作用させるためにキトサン溶液を調製しなければならないが、キトサンは酸に溶けるので、キトサンに酸水溶液を加えてキトサン濃度が1-30%、好ましくは5-10%の溶液とする。この場合、溶液のpHがキトサナーゼの作用最適pH付近となるように添加する酸の量を加減する。例えばバチルスNaK-881由来のキトサナーゼの場合、至適pHは6であるのでキトサン溶液のpHが5-6になるように酸の添加量を調整する。

キトサン溶液の調製に使用する酸は、キトサンを溶解しうるものであれば、有機酸または無機酸のいずれであってもこれを使用することができるが、塩酸、蟻酸、酢酸、乳酸、グルタミン酸等が好ましい。このキトサン溶液にキトサナーゼの粉末または溶液を加え、キトサナーゼの作用温度においてキトサンを分解する。キトサナーゼの作用温度は、例えばバチルス由来のキトサナーゼの場合、30-60℃であるが、40℃前後にするのが好ましい。

本発明において酵素反応によって生ずる低分子

本菌（バチルス属菌NaK-881）の菌学的性質は以下に示す通りである。

(a) 細胞の形態

肉汁または肉汁寒天培地で37℃、24~72時間培養し、観察。

① 細胞の形及び大きさ：短桿菌、

0.5~1.0×1.0~3.0 μm

② 細胞の多形性の有無：未定

③ 運動性の有無：無し

④ 胞子の有無：有り、球形~橢円形の内生胞子、胞子の位置は亜端立または端立

⑤ グラム染色性：陽性

⑥ 抗酸性：陰性

(b) 各培地における生育状態

① 肉汁寒天平板培養(37℃、24~72時間)：

不透明で厚く、乳白色の円形コロニーを形成する。

コロニーの表面には凹凸や光沢が有り色素は産生しない。

② 肉汁寒天斜面培養(37℃、24時間~72時間)：

生育は良好で、時間とともに拡がり、
①の記載に同じ。

- ③ 肉汁液体培養 (37℃、24～72時間) :
培地表面に乳白色の菌膜を形成するが
液は濁らない。
- ④ 肉汁ゼラチン穿刺培養 (25℃、24～72時間) :
穿刺線に浴って生育し、ゼラチンは液
化される。
- ⑤ リトマスミルク (37℃、24～72時間) :
2日目ころより液化及び変色が認めら
れ、酸性となる。凝固は認められない。
時間の経過とともに液化は進み、半透
明となる。

(c) 生理学的性質

- ① 硝酸塩の還元 : 陽性
(酵母エキス添加コハク酸硝酸塩培地, 37
℃, 24～120時間) :
- ② 脱窒反応 : 陰性
(駒形らの方法, 37℃, 24～72時間)
- ③ MRテスト : 陰性

(クリステンセン・ウレア寒天培地, 37℃,
24～72時間)

- ⑫ オキシダーゼ : 陽性
(肉汁寒天培地, 37℃, 24～48時間)
- ⑬ カタラーゼ : 陽性
(肉汁寒天培地, 37℃, 24～48時間)
- ⑭ 生育の範囲
至適温度 : 25～35℃
pH : 5～9
7% NaCl 存在下での生育 : 生育する
- ⑮ 酸素に対する態度 : 好気性
(1% グルコース肉汁高層寒天培地, 37℃,
24～72時間)
- ⑯ O-Fテスト : 酸化 (oxidation)
(ヒュー・ライフソン法, 28℃, D-グル
コース)
- ⑰ 糖類からの酸およびガスの生成の有無
(28℃, 24～72時間)

糖 類	酸	ガス
(1) L-アラビノース	—	—

(37℃, 24～72時間)

- ④ VPテスト : 陽性
(37℃, 24～72時間)
- ⑤ インドールの生成 : 陰性
(37℃, 24～72時間)
- ⑥ 硫化水素の生成 : 陰性
(TSI 寒天法, 37℃, 24～72時間)
- ⑦ デンプンの加水分解 : 陰性
(37℃, 24～72時間)
- ⑧ クエン酸の利用 :
(コーザーの培地, 37℃, 24～72時間) : 未利用
(クリステンセンの培地, 37℃, 24～72時
間) : 利用
- ⑨ 無機窒素源の利用
硝酸塩 : 未利用
アンモニウム塩 : アンモニウム塩を唯一
の窒素源として生育できる。
- ⑩ 色素の生成
(キングA寒天斜面培地) : 陰性
- ⑪ ウレアーゼ : 陽性

(2) D-キシロース	—	—
(3) D-グルコース	+	—
(4) D-マンノース	+	—
(5) D-フラクトース	+	—
(6) D-ガラクトース	—	—
(7) 麦 芽 糖	—	—
(8) シ ョ 糖	+	—
(9) 乳 糖	—	—
(10) トレハロース	—	—
(11) D-ソルビット	+	—
(12) D-マンニット	+	—
(13) イノシット	—	—
(14) グリセリン	+	—
(15) デンプン	—	—
(16) サリシン	+	—

(d) その他の性質

- ① エッグヨーク反応
(37℃, 24～48時間) : 陽性

以上の菌学的性質に基づいて、バージェイズ・
マニュアル・オブ・デターミネーティブ・バクテ

リオロジー (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) の第8版 (1974年) を検索したところ、No.K-881 株はバチルス (Bacillus) 属に属することがわかった。

バチルス属菌No.K-881 により生産されたキトサナーゼの酵素化学的性質は以下に示す通りである。

(1) 作用

キトサンに作用し、 β -1,4 結合を加水分解する。分解型式はエンド型と考えられる。

(2) 基質特異性

本キトサナーゼは、キトサンやコロイダルキトサンには作用するが、粉末キチン、コロイダルキチン、グリコールキチン、カルボキシメチルセルロース(CMC) および α -1,4-ポリガラクトサミンには作用しない。本キトサナーゼは脱アセチル化度80%前後のキトサンを最もよく分解し、さらに脱アセチル化度が低下すると、分解率は急激に低下する。

pH 6.0, 40℃において10分間反応させた場合のキトサンの脱アセチル化度と相対活性の関

連元糖量を測定する。

上記条件下において1分間に1 μ mol のグルコサミンに相当する還元糖を遊離する酵素力価を、1単位(unit)とする。

(5) 作用適温の範囲

60℃まで作用し最適温度は55℃である。

pH 6.0 において10分間反応させた場合の温度と相対活性の関係を第4図に示す。

(6) 熱安定性及び安定化

pH 6, 15分間の加熱処理では50℃以下で安定であるが90℃では完全に失活する。

温度と残存活性の関係を第5図に示す。

なお、本キトサナーゼの熱安定性は、イオン強度によって影響を受け、透析した場合、pH 6, 60℃, 15分間の加熱処理により完全に失活する。

本キトサナーゼは0.1 M以上の塩化ナトリウムによって安定化される。

pH 6, 50℃において15分間加熱処理した場合の残存活性の塩化ナトリウム濃度による影響

係を第1図に示す。

(3) 至適 pH 及び安定 pH

pH 4~8 の範囲において作用し、至適 pH は6.0 である。40℃において10分間反応させた場合の反応液 pH と相対活性の関係を第2図に示す。

また40℃において30分間加熱処理した場合、安定 pH の範囲は第3図に示すとおり5~8 である。

(4) 酵素力価の測定法

キトサン (脱アセチル化度75~90%, 16メッシュ以下) 0.5 g を、0.075N 酢酸90ml に溶解し、水酸化ナトリウム溶液で pH 6.0 に調整した後、水で全容を100ml として基質のキトサン溶液を調製する。

このキトサン溶液0.5 ml に酵素溶液0.5 ml (約0.025unit のキトサナーゼを含む) を添加し、40℃で10分間酵素反応を行わせる。その後反応液にアセチルアセトン溶液1 ml を加え、ロンドル・モルガン法により反応液中に生成した

を第6図に示す。

(7) 阻害及び活性化

本キトサナーゼは0.05M の NiSO_4 , ZnSO_4 , CuSO_4 , Ca(OH)_2 によりほぼ100%が阻害される。

また、0.05M の NaCl , KCl , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , MnCl_2 による活性化が認められる。ただし、活性化の程度は基質のキトサンによって異なる。

なお、本キトサナーゼはEDTA による活性化は認められない。

(8) 精製方法

本キトサナーゼの精製は、例えば次のように行う。培養液の水溶性画分を硫酸塩析または有機溶媒沈澱により分画した後、透析を行い、さらに0.005M の酢酸緩衝液(pH 4.5) で平衡化した SP-トヨパール 650S カラム (東ソー製) を用いてイオン交換クロマトグラフィーを行う。次にトヨパール HW-50S によるゲル濾過クロマトグラフィーにより精製する。

(9) 分子量

0.1 Mリン酸緩衝液(0.2 M硫酸ナトリウム含有)を用い、TSKゲル G3000SWグラス カラム(東ソー製)によるゲル濾過クロマト法により測定すると、分子量約31,000である。

00 等電点

アクリルアミド焦点電気泳動法により等電点を測定すると8.4である。

本発明においてキトサナーゼ処理の後、または酵素反応途中において、アルカリを加えて反応液のpHを7-10に上げ、キトサン中のアミノ基のアンモニウム塩形成を破壊し、水不溶性キトサンを析出させる。本発明に使用するアルカリとしては、水溶液中においてアルカリ性を示す物質であれば良く、例えばナトリウムやカリウムの水酸化物を用いることができるが、水酸化ナトリウムの水溶液を用いることが好ましい。水不溶性キトサンの量が少ない場合には、使用用途によってはそのままでも利用可能である。この場合は必要に応じて脱塩操作を行い、凍結乾燥法または噴霧乾燥

法等により乾燥粉末化する。一方水不溶性キトサンを除去した水溶性低分子化キトサンを調製する場合には、濾過または膜分離操作を行った後に用途により乾燥粉末化を行う。また必要に応じて膜分離工程の前あるいは後で脱塩操作を行う。本発明においてキトサンの膜処理に使用できる膜としては、孔径0.05 μ m乃至5 μ mの精密濾過膜または分画分子量1万以上の限外濾過膜がある。ここで言う精密濾過膜としては、たとえばセラミック膜(東芝セラミックス社製 メンブラロックセラミックフィルター、日本ガイシ社製 セラミックフィルター、日本セメント社製 セラミックフィルター、久保田鉄工社製セラミックフィルター等)、ポリオレフィン系膜(旭化成社製 マイクロザ膜等)、ポリビニルアルコール系膜(クラレ社製 SFフィルター等)、ポリプロピレン系膜(日東電工社製 N T M膜等)、ポリカーボネート系膜(スルザー社製 W O膜等)、ポリスルホン系膜(富士フィルム社製 P S E膜等)、ポリビニリデンフロライド系膜(ミリポア・リミテ

ッド製 デュラポア膜等)、テフロン系膜(ザルトリウス社製 ザルトフロル膜、キューノ社製 テフロンフィルター等)、セルロース系膜(富士フィルム社製 F M膜、ミリポア・リミテッド製 M F - ミリポア膜、ザルトリウス社製 ザルトブラン等)等を挙げることができる。またここで言う限外濾過膜としては、たとえばポリスルホン系膜(ミリポア・リミテッド製 P T膜、日東電工社製 N U T膜等)、セルロース系膜(ミリポア・リミテッド製 P T膜等)、ポリアクリルニトリル系膜(旭化成社製 A C V膜等)などを挙げることができる。

(発明の効果)

以上説明したように、本発明の製造方法によれば脱アセチル化度60-90%のキトサンから比較的分子量の大きな水溶性低分子化キトサンを温和な条件で収率よく製造することができ、しかも従来の方法では極大分子量3,000以下あるいは12,000をこえるものしか得られず、しかも脱アミノ化による品質低下といった欠点があったのを、本発明

の製造方法によってこれらの欠点を解消することができた。本来、キトサンはポリカチオン性、皮膜形成能等の性質を持つ機能性の高い高分子であり、食品、医薬品、化粧品等の分野で広く利用できるものであるが、生体のpHである中性付近では不溶性であるという難点を有する。しかるに本発明の製造方法によって得られる水溶性低分子化キトサンは、極大分子量が主として4,000-12,000と高く、キトサン本来のポリカチオン性、皮膜形成能という特性を有しながら、酸性乃至アルカリ性の水溶液に可溶であり、更に化学的な修飾を行っていないため原料のキトサンと同様に安全性が高く、食品、医薬品、化粧品をはじめとして広く利用することができる。

以下に参考例、実施例及び比較例を示して本発明を具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

参考例(1)

(種 培 養)

500 ml 容三角フラスコに、デンプン3%, ペプ

トン5%, リン酸一カリウム0.1%, 硝酸ナトリウム0.1%, 硫酸マグネシウム0.05%を含む液体培地(pH 6.0)100mlを入れ、常法により滅菌した後、バチルス属菌(*Bacillus* sp.) NaK-881(微工研菌寄第10257号)を接種し、28℃において1日間振とう培養し、種培養液とした。

(酵素生産用培養)

5ℓ容三角フラスコ5本に、上記と同一の組成の液体培地をそれぞれ600mlずつ入れ、常法により滅菌した後、この培地に上記の種培養液10mlを接種し、28℃において5日間振とう培養した。

(酵素の調製)

上記で得られた培養液を遠心分離(7000rpm)により菌体を除去した。得られた上澄液のキトサナーゼ活性は5.2u/mlであった。この上澄液2700mlに固体硫酸1515g(硫酸80%飽和に相当)を加え、濾過し、得られた沈澱物をイオン交換水に溶解し、イオン交換水に対して1日間透析を行った後、真空凍結乾燥を行い、粗酵素キトサナーゼの粉末77.5gを得た。本品のキトサナーゼ活性は105u/g

トサン 80H; 粘度(0.5W/V%, 20℃)180cp) 7.5gにイオン交換水 115ml及び1N酢酸水溶液25mlを加えて溶解した(pH 5.9)。このキトサン溶液を14mlずつL字試験管に取り、キトサナーゼ溶液(参考例(1)のキトサナーゼ粉末0.143gを水1mlに溶かす: 15u/ml) 1mlを加え40℃の恒温水槽内で振とうしながら15分間、1時間、5時間、23時間反応した後、L字試験管を沸とう水浴中に浸漬し、反応を停止させた。これらの反応液につき、Asahipak GS-320カラム(旭化成工業製)を用いた高速液体クロマトグラフィー法により分子量を測定した。その結果は第7図に示すとおりであった。

上記条件下で反応した場合、反応時間は15分前後が適当であった。

実施例 (1)

500ml容のビーカーに脱アセチル化度72%のキトサン(和光純薬, キトサン 70H) 12.5gを取り、これにイオン交換水 210ml及び1N酢酸水溶液39mlを加えて充分攪拌し、均一な溶液とした。このキトサン酢酸溶液のpHは5.8であった。このキ

であった。

参考例(2)

参考例(1)で得られた粗酵素キトサナーゼ粉末10gを0.005Mの酢酸緩衝液(pH 4.5)150mlに溶解し、遠心分離で不溶物を除去した後、0.005M酢酸緩衝液(pH 4.5)で平衡化したSP-トヨパール650Sカラム(直径2.2cm×長さ20cm, 東ソー製)によるイオン交換クロマトグラフィー(流速: 3ml/分)を行った。0~0.5Mの塩化ナトリウムの直線濃度勾配により、酵素を溶出させ、酵素活性フラクションを集め、次にダイアフロームメンブレンフィルター PM-10(アミコン社製)で濃縮した。この液を0.1Mリン酸緩衝液(pH 6)で平衡化したトヨパールHW50Sカラム(直径2cm×長さ100cm, 東ソー製)を用いるゲル濾過クロマトグラフィーを行った。活性フラクションを集め、精製キトサナーゼ溶液15ml(総活性326units)を得た。比活性は39.4unit/タンパク質mgであった。

参考例(3)

脱アセチル化度81%のキトサン(和光純薬, キ

トサン酢酸溶液にキトサナーゼ溶液(参考例(1)のキトサナーゼ粉末38mgを水1mlに溶かす: 4u/ml) 1mlを加え40℃の恒温水槽内で攪拌しながら12時間反応した後、反応液を加熱して酵素反応を停止させた。つぎに10%水酸化ナトリウム溶液14mlを加えてpHを8に調整すると不溶物を生ずる。この反応液を透析膜を用いた透析により脱塩した後、脱塩液 345mlを孔径0.2μm、膜面積0.02㎡のセラミックフィルター(日本セメント社製)を用いて濾過し、305mlの透明な濾過液を得た。この液を凍結真空乾燥法で乾燥し、粉末の水溶性低分子化キトサン8.2gを得た。(なおセラミックフィルター濾過残を乾燥したところ3.0gであった。)

実施例 (2)

脱アセチル化度81%のキトサン(和光純薬, キトサン 80H) 12.5gを取り、これにイオン交換水 207ml及び1N酢酸水溶液42mlを加えて溶解した(pH 5.9)。そして、実施例(1)と同様な条件で酵素処理、pH調整、脱塩、膜処理、乾燥を行い、水

溶性低分子化キトサン8.8gを得た。(なおセラミックフィルター濾過残を乾燥したところ2.7gであった。)

実施例 (3)

脱アセチル化度87%のキトサン(和光純薬、キトサン 90M) 12.5gを取り、これにイオン交換水 199ml及び1N酢酸水溶液50mlを加えて溶解した(pH5.8)。そして実施例(1)と同様な条件で酵素処理、pH調整、脱塩、膜処理、乾燥を行い、水溶性低分子化キトサン7.3gを得た。(なおセラミックフィルター濾過残を乾燥したところ3.6gであった。)

比較例 (1)

脱アセチル化度59%のキトサン12.5gを取り、これにイオン交換水 223ml及び1N酢酸水溶液26mlを加えて溶解した(pH5.3)。そして実施例(1)と同様な条件で酵素処理、pH調整、脱塩、膜処理、乾燥を行い、水溶性の低分子化キトサン7.7gを得た。(なおセラミックフィルター濾過残はほとんどなかった。)

第1表に示す。

極大分子量はウォーターズ社製高速液体クロマトグラフ装置(M600 マルチソルベント送液システム、710B型全自動サンプルプロセッサ、M410型示差屈折計)およびAsahipakGS-320カラム(旭化成工業製)を用い、標準物質としてプルランを用いるGPC法で測定した(ピーク頂点の保持時間より求めた分子量を、極大分子量とする)。また脱アセチル化度は、メチレンブルーを指示薬としてキトサンの酢酸水溶液をポリビニル硫酸カリウム水溶液で滴定するコロイド滴定法により測定した。

第1表の結果より、原料キトサンの脱アセチル化度と、得られた水溶性の低分子化キトサンの分子量とに関連性が認められ、特に脱アセチル化度が90%を超えると水溶性となる低分子化キトサンの分子量が低下する傾向が認められる。そして低分子化すると、還元基の割合が増えるために水溶液中においてアミノ・カルボニル反応(メイラード反応)等により褐変しやすくなる。一方、本発

比較例 (2)

脱アセチル化度93%のキトサン(北海道曹達 CS-90)12.5gを取り、これにイオン交換水 166ml及び1N酢酸水溶液83mlを加えて溶解した(pH5.3)。そして実施例(1)と同様な条件で酵素処理、pH調整、脱塩、膜処理、乾燥を行い、水溶性の低分子化キトサン3.0gを得た。(なおセラミックフィルター濾過残を乾燥したところ5.4gであった。)

比較例 (3)

脱アセチル化度100%のキトサン(和光純薬、キトサン100L) 12.5gを取り、これにイオン交換水 185ml及び1N酢酸水溶液64mlを加えて溶解した(pH5.5)。そして実施例(1)と同様な条件で酵素処理、pH調整、脱塩、膜処理、乾燥を行い、水溶性の低分子化キトサン1.2gを得た。(なおセラミックフィルター濾過残を乾燥したところ4.9gであった。)

つぎに実施例(1)、(2)、(3)および比較例(1)、(2)、(3)で得た水溶性低分子化キトサン及び低分子化キトサンの分子量および加熱時の色調増加の比較を

明により得られた水溶性の低分子化キトサンは褐変の程度が低く、また分子量も比較的大きい。

(本頁以下余白)

第 1 表

項 目		比較例 (1)	実施例 (1)	実施例 (2)	実施例 (3)	比較例 (2)	比較例 (3)	
原料キトサンの脱アセチル化度		59%	72%	81%	87%	93%	100%	
水溶性低分子化キトサン	極大分子量	26,000	9,500	7,500	8,400	1,300	990	
	分 子 量 分 布	~10 ³	1%	4%	8%	9%	30%	33%
		10 ³ ~ 3 × 10 ³	10%	18%	23%	23%	43%	42%
		3 × 10 ³ ~ 10 ⁴	30%	43%	41%	41%	21%	20%
		10 ⁴ ~ 3 × 10 ⁴	41%	29%	25%	24%	5%	3%
		3 × 10 ⁴ 以上	18%	6%	3%	3%	1%	2%
	溶 解 性 *1	○	○	○	○	○	○	
	フェノール、硫酸法によるグルコース換算糖量	2.1%	2.3%	2.4%	2.8%	2.5%	8.2%	
加熱時の色調増加 *2	0.046	0.042	0.061	0.071	0.081	0.146		
濾過残キトサン	極大分子量		28,000	19,000	16,000	6,800	1,500	
	分 子 量 分 布	~10 ³		1%	2%	3%	4%	12%
		10 ³ ~ 3 × 10 ³		7%	8%	10%	33%	48%
		3 × 10 ³ ~ 10 ⁴		26%	31%	37%	40%	31%
		10 ⁴ ~ 3 × 10 ⁴		46%	43%	41%	22%	9%
		3 × 10 ⁴ 以上		20%	16%	9%	2%	1%
	溶 解 性 *1		×	×	×	×	0-26	

* 1 水及び4% NaOH 液に対する溶解性(1%溶液) ○: 不溶物を認めない ×: 不溶物を認める

* 2 低分子キトサンの1%水溶液を100℃、5分間加熱処理した時の400nmにおける吸光度値の増加量

実施例 (4)

脱アセチル化度87%のキトサン(和光純薬、キトサン 90M) 12.5g を用いて実施例(3)と同様な条件で酵素処理、pH調整を行い、精密濾過膜 旭化成工業社製 マイクロザ XPW-11(孔径0.1μm、膜面積0.1㎡)を用いて濾過し、濾液を電気透析装置マイクロアシライザー G3(旭化成工業社製)により脱塩した後、凍結真空乾燥法で乾燥し、粉末の水溶性低分子化キトサン9.7gを得た。

比較例 (4)

脱アセチル化度87%のキトサン(和光純薬、キトサン 90M) 13.9g を亜硝酸ナトリウム0.95gを含む水溶液65mlに室温で5分間浸漬した後、酢酸7.5gを添加し、室温で2時間反応させる。反応後、水210mlを加え、40%水酸化ナトリウム溶液でpHを9に調整し、実施例(4)と同様にして濾過を行い、透析した後、凍結真空乾燥を行い6.2gの粉末を得た。

次に実施例(4)および比較例(4)で得た粉末の分子量及びフェノール硫酸法によるグルコース換算糖

量の比較を第2表に示す。

第2表の結果により、従来技術である亜硝酸塩処理により得られた低分子化キトサンでは、極大分子量が3000付近と低く、また脱アミノ化が生じるために、フェノール硫酸法によるグルコース換算糖量値が高い値を示す。一方、本発明により得られた水溶性低分子化キトサンでは、極大分子量が比較的大きく、また、脱アミノ化の程度も低いことがフェノール硫酸法によるグルコース換算糖量値より類推される。

第 2 表

項 目		実施例 (4)	比較例 (4)	
原料キトサンの脱アセチル化度		87%	87%	
水溶性低分子化キトサン	極 大 分 子 量	8200	3100	
	分子 量 分 布	$\sim 10^3$	9	9
		$\sim 3 \times 10^3$	21	29
		$\sim 10^4$	42	56
		$\sim 3 \times 10^4$	27	22
		3×10^4	2	4
	溶 解 性	○	○	
ろ 過 残 量	2.3%	10.6%		

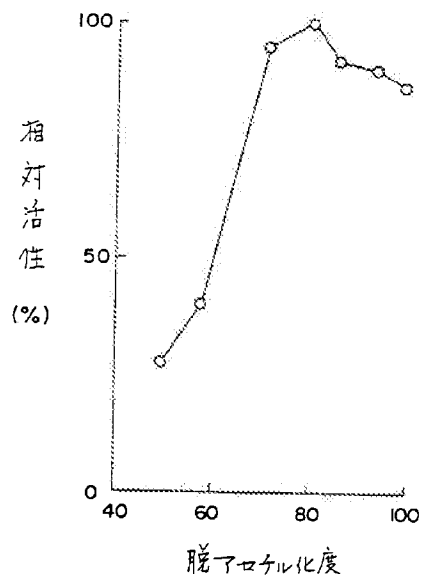
4. 図面の簡単な説明

第1図は、キトサンの脱アセチル化度と本発明により得られたキトサナーゼの相対活性の関係を示す図であり、第2図は至適 pH、第3図は安定 pH 範囲、第4図は作用適温の範囲、第5図は熱安定、第6図は熱安定性に対する塩化ナトリウム濃度の影響を示す図である。第7図は、参考例(3)における酵素反応の時間とキトサンの分子量分布を示す図である。

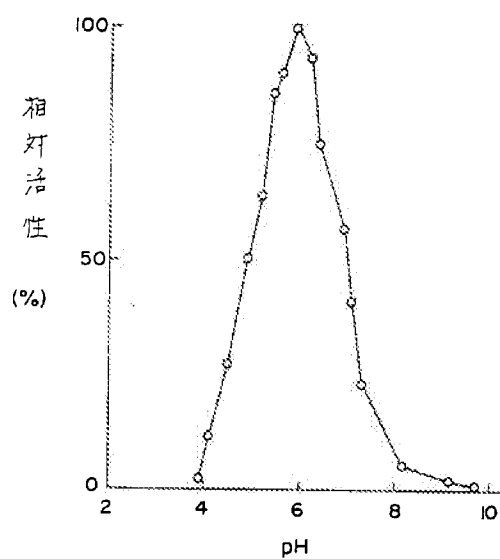
出願人 ケイ・アイ化成株式会社

代理人 弁理士 平 木 祐 輔

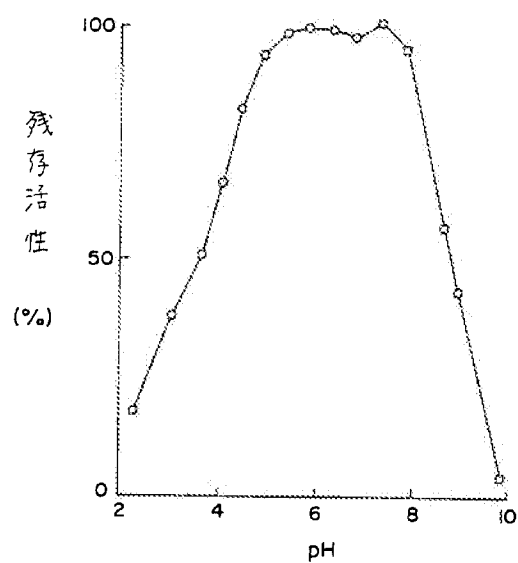
同 弁理士 石 井 貞 次



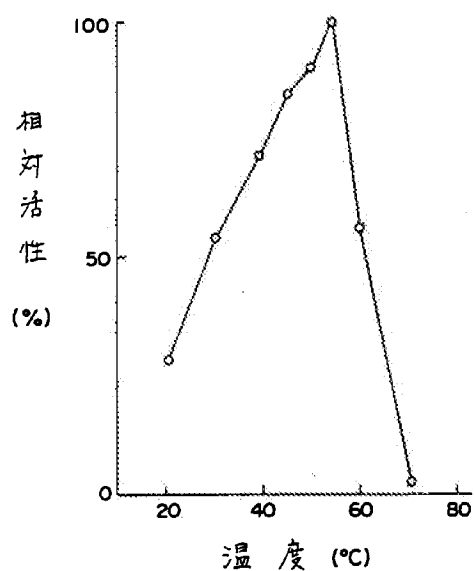
第 1 図



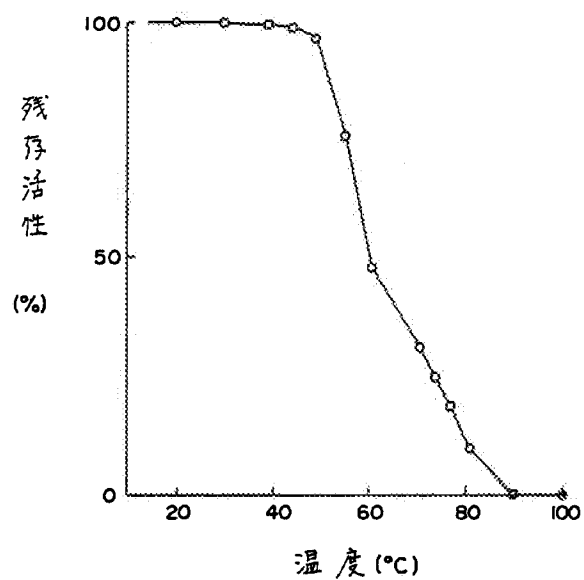
第 2 図



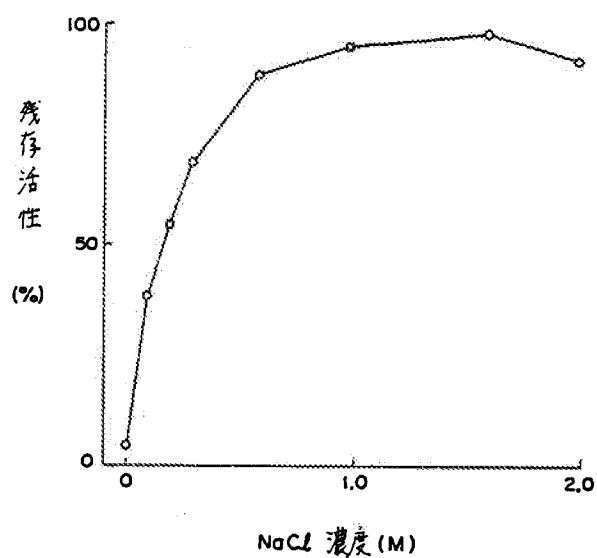
第 3 図



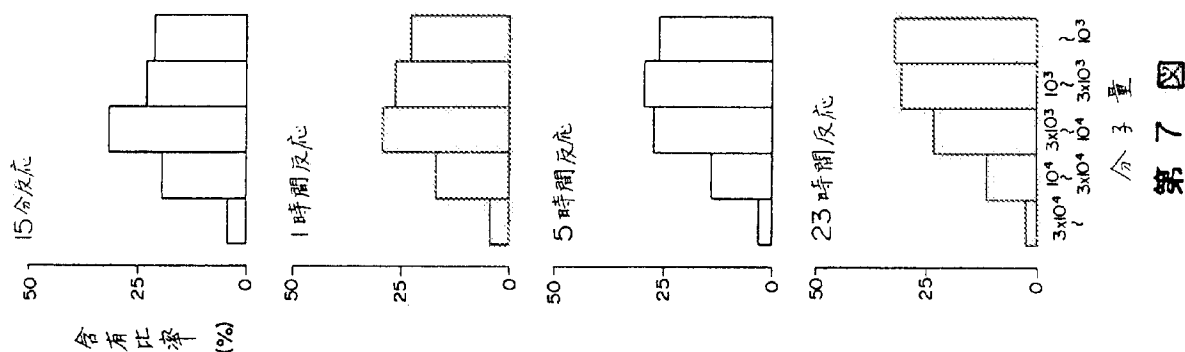
第 4 図



第 5 図



第 6 図



第7図

手続補正書

平成 元年11月29日

特許庁長官 吉田文毅 殿

1. 事件の表示

昭和63年特許願第220377号

2. 発明の名称

水溶性低分子化キトサンおよびその製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 静岡県磐田郡福田町塩新田浜野328

名称 ケイ・アイ化成株式会社

代表者 鈴木 操

4. 代理人

住所 東京都港区虎ノ門1丁目15番7号

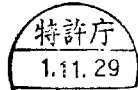
TG115ビル7階

氏名 (9109) 弁理士 平木 祐

(ほか1名)

5. 補正命令の日付

自 発



6. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

7. 補正の内容

- (1) 明細書第15頁第17行目「24～120時間：」とあるを「24～120時間)」と訂正する。
- (2) 明細書第20頁第4行目「6.0」とあるを「約6.0」と訂正する。
- (3) 明細書第21頁第6行目「55℃」とあるを「約55℃」と訂正する。
- (4) 明細書第22頁第1行目と2行目の間に以下の文を挿入する。
「この他に、塩化カリウム等のアルカリ金属塩や塩化アンモニウム、塩化マンガン、硫酸アンモニウム、硫酸マグネシウムによって安定化が認められる。」
- (5) 明細書第22頁第4行目「CuSO₄・Ca(OH)₂により」とあるを「CuSO₄により」と訂正する。